LINEA LIQUIDA

Colestat

enzimático AA

Método enzimático para la determinación de colesterol en suero o plasma

SIGNIFICACION CLINICA

La determinación de colesterol en forma aislada tiene utilidad diagnóstica limitada. Sin embargo, su concentración varía de manera más o menos predecible en un gran número de condiciones clínicas.

Se ha visto que el colesterol es uno de los factores contribuyentes a la formación de ateromas dado que las complicaciones arterioscleróticas prevalecen en individuos hipercolesterolémicos.

Diversos estudios epidemiológicos han permitido observar además, que el riesgo de contraer enfermedad cardíaca coronaria (ECC) para los individuos varones de más de 40 años con colesterolemia menor o igual a 2,10 g/l es 3 veces menor que entre individuos con más de 2,30 g/l y 6 veces menor que entre individuos con más de 2,60 g/l.

FUNDAMENTOS DEL METODO

La secuencia reaccional es la siguiente:

$$\text{ésteres del colesterol} \xrightarrow{\text{CHE}} \text{colesterol + ácidos grasos}$$

$$\text{colesterol} + O_2 \xrightarrow{\text{CHOD}} \text{colesten-3-ona} + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + \text{4-AF} + \text{aceptor} \xrightarrow{\text{POD}} \text{quinonimina roja}$$

REACTIVOS PROVISTOS

Standard*: solución de colesterol 2 g/l.

Reactivo: solución conteniendo colesterol esterasa (CHE), colesterol oxidasa (CHOD), peroxidasa (POD), 4-aminofenazona (4-AF) y buffer Good pH 6,8, conteniendo fenol y colato de sodio, en las siguientes concentraciones:

CHE	≥100 U/l
CHOD	≥ 100 U/l
POD	≥ 1000 U/l
4-AF	0,2 mmol/l
Good	50 mmol/l, pH 6,8
Fenol	15 mmol/l
Colato de sodio	0,2 mmol/l

REACTIVOS NO PROVISTOS

Calibrador A plus provisto separadamente por Wiener lab. cuando se emplea la técnica automática.

INSTRUCCIONES PARA SU USO

Reactivos Provistos: listos para usar.

PRECAUCIONES

Los reactivos son para uso diagnóstico "in vitro".

** No provisto en todas las presentaciones*

ESTABILIDAD E INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO

Reactivos Provistos: son estables en refrigerador (2-10ºC) hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja. No mantener a temperaturas elevadas durante lapsos prolongados.

INDICIOS DE INESTABILIDAD O DETERIORO DE LOS REACTIVOS

Lecturas del Blanco superiores a 0,160 D.O. son indicio de deterioro de los reactivos. En tal caso desechar.

MUESTRA

Suero o plasma

a) Recolección: se debe obtener de la manera usual.

b) Aditivos: en caso de que la muestra a emplear sea plasma, se recomienda únicamente el uso de heparina como anticoagulante para su obtención.

c) Sustancias interferentes conocidas:

- Excepto la heparina, los anticoagulantes comunes interfieren en la determinación.
- Los sueros con hemólisis visible o intensa producen valores falsamente aumentados por lo que no deben ser usados.
- No se observan interferencias por bilirrubina hasta 80 mg/l, ácido ascórbico hasta 75 mg/l, ácido úrico hasta 200 mg/l, ni hemólisis ligera.

Referirse a la bibliografía de Young para los efectos de las drogas en el presente método.

d) Estabilidad e instrucciones de almacenamiento: el colesterol en suero es estable por lo menos 1 semana en refrigerador y 2 meses en congelador, sin agregado de conservantes.

MATERIAL REQUERIDO (no provisto)

- Espectrofotómetro o fotocolorímetro.
- Micropipetas y pipetas para medir los volúmenes indicados.
- Tubos de fotocolorímetro o cubetas espectrofotométricas de caras paralelas.
- Baño de agua a 37ºC.
- Reloj o timer.

CONDICIONES DE REACCION

- Longitud de onda: 505 nm en espectrofotómetro o en fotocolorímetro con filtro verde (490-530 nm).
- Temperatura de reacción: 37ºC
- Tiempo de reacción: 5 minutos
- Volumen de muestra: 10 ul
- Volumen de Reactivo: 1 ml
- Volumen final de reacción: 1,01 ml

Los volúmenes de Muestra y Reactivo pueden variarse proporcionalmente (Ej.: 20 ul de Muestra + 2 ml de Reactivo).

PROCEDIMIENTO
En tres tubos de fotocolorímetro o cubetas espectrofotométricas marcadas B (Blanco), S (Standard) y D (Desconocido), colocar:

	B	S	D
Standard	-	10 ul	-
Muestra	-	-	10 ul
Reactivo	1 ml	1 ml	1 ml

Incubar 5 minutos en baño de agua a 37°C o 20 minutos a temperatura ambiente (25°C). Leer en espectrofotómetro a 505 nm o en fotocolorímetro con filtro verde (490-530 nm), llevando el aparato a cero con el Blanco.

ESTABILIDAD DE LA MEZCLA DE REACCION FINAL
El color de reacción final es estable 30 minutos, por lo que la absorbancia debe ser leída dentro de este lapso.

CALCULO DE LOS RESULTADOS

$$\text{colesterol (g/l)} = D \times f \qquad \text{donde } f = \frac{2{,}00 \text{ g/l}}{S}$$

CONVERSION DE UNIDADES
colesterol (g/l) = colesterol (mg/dl) x 0,01
colesterol (mmol/l) = colesterol (g/l) x 2,59
colesterol (g/l) = colesterol (mmol/l) x 0,39

METODO DE CONTROL DE CALIDAD
Standatrol S-N y Standatrol S-E 2 niveles.

VALORES DE REFERENCIA
El panel de expertos del National Cholesterol Education Program (NCEP) provee los siguientes valores de colesterol:

Deseable: < 2,00 g/l
Moderadamente alto: 2,00 - 2,39 g/l
Elevado: ≥ 2,40 g/l

No obstante, se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios intervalos o valores de referencia.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO
Ver Sustancias interferentes conocidas en MUESTRA.
Los reductores disminuyen la respuesta de color mientras que los oxidantes colorean el Reactivo aumentando los Blancos.
Los detergentes, metales pesados y cianuros son inhibidores enzimáticos.
No emplear el Standard en analizador automático debido a la distinta tensión superficial con respecto al suero, dada por el disolvente empleado en su preparación.
Se recomienda realizar una recalibración semanal o cada vez que se obtengan valores fuera del rango aceptable de los controles (Standatrol S-N o S-E 2 niveles).

PERFORMANCE
a) Reproducibilidad: procesando replicados de las mismas muestras en 10 días diferentes, se obtuvo:

Nivel	D.S.	C.V.
1,24 g/l	± 0,043 g/l	3,49 %
3,31 g/l	± 0,115 g/l	3,48 %

b) Recuperación: agregando cantidades conocidas de colesterol a distintos sueros, se obtuvo una recuperación entre 98 y 101%, para todo nivel de colesterol entre 1,90 y 4,79 g/l.
c) Límite de detección: depende del fotómetro empleado. Para una lectura de 0,001 D.O., el cambio mínimo de concentración detectable será aproximadamente de 0,0063 g/l.
d) Linealidad: la reacción es lineal hasta 5 g/l. Para valores superiores, diluir 1:2 con el Blanco y repetir la lectura multiplicando el resultado final por 2.

PARAMETROS PARA ANALIZADORES AUTOMATICOS
Longitud de onda primaria ..... 505 nm
Longitud de onda secundaria ..... 600-700 nm
Tipo de reacción ..... punto final
Dirección de la reacción ..... aumenta
Temperatura de reacción ..... 37°C
Relación muestra/reactivo 1:100
Tiempo de equilibrio ..... 3 segundos
Tiempo de retardo ..... 300 segundos
Tiempo de lectura ..... 5-20 segundos
Absorbancia de blanco ..... < 0,250 D.O.
Límite de absorbancia ..... 2,000 D.O.
Linealidad ..... 5 g/l
Para las instrucciones de programación debe consultarse el Manual del Usuario del Analizador en uso. Para la calibración debe emplearse **Calibrador A plus** de Wiener lab., de acuerdo a los requerimientos del analizador.

PRESENTACION
- 6 x 60 ml (Cód. 1009308).
- 4 x 100 ml (Cód. 1220114).
- 2 x 100 ml (Cód. 1220221).
- 2 x 500 ml (Cód. 1220222).

Empleando los reactivos **Colestat *enzimático AA líquida*** junto con **HDL-Colesterol *Reactivo Precipitante*, HDL Colesterol FT y LDL-Colesterol *Reactivo Precipitante*** (provistos separadamente por Wiener lab.) es posible determinar el colesterol ligado a las lipoproteínas de alta densidad (HDL-colesterol) y a las lipoproteínas de baja densidad (LDL-colesterol).

BIBLIOGRAFIA

- Abell, L.L. et al. - J. Biol. Chem. 195:357 (1952).
- Allain, C.C. et al.. - Clin. Chem. 20:470 (1974).
- American Health Foundation - Position statement on diet and coronary heart disease - pág. 255 (1972).
- I.F.C.C. - Clin. Chim. Acta 87/3:459 F (1978).
- Trinder, P. - Ann. Clin. Biochem. 6/24 (1969).
- Coniglio R.I. - Acta Bioq. Clin. Latinoam. XXIII/2:201 (1989).
- Expert Panel of National Cholesterol Education Program - JAMA 285/19:2486 (2001).
- Young, D.S. - "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", AACC Press, 3rd ed., 1990.

Elaborado por:
Wiener Laboratorios S.A.I.C.
Riobamba 2944
2000 - Rosario - Argentina
http://www.wiener-lab.com.ar
Dir. Téc.: Viviana E. Cétola
Bioquímica
Producto Inscripto M.S.
Disp. Nº: 7795/98 - 44/02

Wiener lab.
2000 Rosario - Argentina